

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-101297

(43)Date of publication of application : 15.04.1997

(51)Int.Cl.

G01N 31/22

G01N 33/52

(21)Application number : 07-293242

(71)Applicant : KDK CORP

(22)Date of filing : 04.10.1995

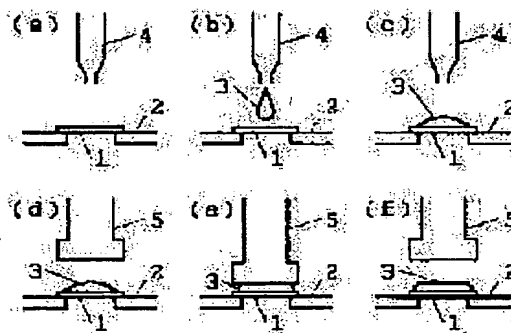
(72)Inventor : SAKAMOTO HISASHI
TAKAHASHI YOSHINORI
HIGUCHI YOSHIHIKO
YAMAGUCHI TAKEHIRO

(54) ANALYTICAL ELEMENT AND ITS PREPARATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To solve such a problem as the preparing size, accuracy, uniformity, etc., which is encountered in preparing an analytical element which used for analyzing a liquid sample for a specific component by applying or printing a reagent solution to a film.

SOLUTION: A reagent solution 3 containing a reagent which is required for analysis is dropped onto a film 1 with a dispenser 4. After dropping the solution 3, the surface of the solution 3 is smoothed with a pressure bar 5 having a smooth surface and the solution 3 is dried. When the solution 3 dries, the bar 5 is removed from the surface of the solution 3. Therefore, an analytical element used for analyzing a liquid sample for a specific component can be prepared quickly and easily with accuracy and, in addition, this analytical element can be used for analyzing a very small amount of liquid sample for multiple components.



BEST AVAILABLE COPY

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

15.07.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3627026

[Date of registration]

17.12.2004

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-101297

(43) 公開日 平成9年(1997)4月15日

(51) Int.Cl.⁹

G 0 1 N 31/22
33/52

識別記号

1 2 1

庁内整理番号

F I

G 0 1 N 31/22
33/52

技術表示箇所

1 2 1 F
B

審査請求 未請求 請求項の数 8 書面 (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平7-293242

(22) 出願日

平成7年(1995)10月4日

(71) 出願人 000141897

株式会社京都第一科学

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(72) 発明者 坂本 久

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

(72) 発明者 高橋 好範

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

(72) 発明者 樋口 善彦

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

最終頁に続く

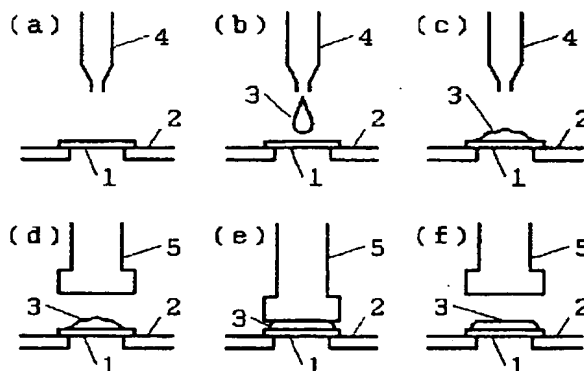
(54) 【発明の名称】 分析要素及びその作製方法

(57) 【要約】

【課題】 液体試料中の特定成分を分析するための分析要素の作製方法としては、試薬液をフィルム上に塗布、印刷することなどがあるが、これらの作製方法における作製規模、精度、均一性などの問題点を解決する。

【解決手段】 分析するために必要な試薬を含む試薬液を、ディスペンサーにてフィルム上に滴下または点着し、ただちに試薬表面を、平滑な面を有する圧力棒で加圧しながら試薬表面を平滑化し、乾燥させ、乾燥後、圧力棒を試薬面から離す。

【効果】 これによって、迅速かつ簡易に、しかも精度良く、液体試料中の特定成分を分析するための分析要素が作製できた。しかも、極めて少量の試料で、多項目分析することも可能になった。



BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 体液試料中の特定成分を分析するための分析要素の作製方法であって、分析するために必要な試薬を含む試薬液を、ディスペンサーにてフィルム上に滴下または点着することを特徴とする分析要素の作製方法。

【請求項2】 分析するために必要な試薬を含む試薬液を、ディスペンサーにてフィルム上に滴下または点着した後、試薬表面を平滑化することを特徴とする、請求項1記載の分析要素の作製方法。

【請求項3】 試薬表面を平滑化させる方法が、試薬表面を、平滑な面を有する圧力棒の平滑な面で押し、加圧しながら試薬表面を平滑化し、乾燥させ、乾燥後、圧力棒を試薬面から離すことによる請求項1又は2記載の分析要素の作製方法。

【請求項4】 圧力棒で加圧する圧力が、 $0.1 \sim 20 \text{ kg/cm}^2$ である請求項1～3、いずれかに記載の分析要素の作製方法。

【請求項5】 乾燥方法が、圧力棒自身を熱することによる加熱である請求項1～4、いずれかに記載の分析要素の作製方法。

【請求項6】 乾燥方法が、圧力棒で加圧している際に、フィルムの方からの加熱である請求項1～4、いずれかに記載の分析要素の作製方法。

【請求項7】 乾燥方法が、圧力棒で加圧している際に、フィルムの方からの送風である請求項1～4、いずれかに記載の分析要素の作製方法。

【請求項8】 体液試料中の特定成分を分析するための分析要素であって、請求項1～7、いずれかに記載の作製方法によって作製され、平滑な試薬表面を有することを特徴とする分析要素。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、体液試料、つまり、全血、血清、血漿、尿および髄液などに含まれる特定成分を分析するための分析要素及びその作製方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 これまで、体液試料中の特定成分を分析する分析要素は、多くのものが開発されてきた。これらは、例えば血液中のグルコース、コレステロール、蛋白質、ビリルビン、尿酸、又は尿中のpH、グルコース、ケトン体、蛋白質、ビリルビン、ヘモグロビンなどを定量するためのものである。これらは、紙またはプラスチック材をマトリックスとして試薬類を含有しており、迅速、簡易さの面で湿式化学以上の性能を有するものが得られている。

【0003】 例えば、特公昭49-33800号には、酸化酵素及び過酸化酵素などを含む検出系をポリマー中に分散させてプラスチックフィルムに塗布した耐水性

の分析要素が開示されている。

【0004】 特開平2-150751号には、試薬液を塗布および乾燥した多孔性フィルムを、支持体の貫通穴を覆うように配置して、支持体上に固定し、次いで試料保持層を、試薬層を覆うように配置して支持体上に固定することによって製造しうる分析要素が開示されている。ここにおける多孔性フィルムおよび試料保持層の支持体への固定は、例えば、熱可逆性樹脂を用いて熱圧着するか、または両面テープを用いて行うことができる。

【0005】 特開平2-150751号に記載されているような従来の分析要素では、 $20 \sim 50 \mu\text{l}$ の血液を採取する必要がある。これは、かなりの苦痛を伴い、場合によっては傷をつけた指先方向に腕や手のひらをしごき、血液をしぼり出すことも行っている。このようなことから、近年、極めて少量の血液で分析可能な分析要素が望まれている。

【0006】 多項目化も望まれてきており、これは、例えばグルコース、コレステロール、尿酸、ケトン体などの項目を同時に測定するというものである。

【0007】 つまり、極めて少量の血液、例えば $5 \sim 10 \mu\text{l}$ の血液で、多項目を同時に分析することが、究極的に望まれてきた。

【0008】 分析要素の大きさは、出来る限り小さい方が好ましく、例えば $1 \sim 30 \text{ mm}^2$ で作製されるのが好ましい。

【0009】 従来、分析要素の作製方法は、含浸法やナイフコーター等による塗布法が用いられてきたが、これらの方法では、一度に巨大な面積範囲の分析要素、例えば幅 $30 \sim 100 \text{ cm}$ で、長さ $10 \sim 400 \text{ m}$ のような形態で作製される為、比較的小さい範囲の分析要素を作製する方法としては、不適當であった。

【0010】 特開昭63-218863号に、酸化酵素及び過酸化酵素などを含む検出系をポリマー中に分散させてインキ化し、プラスチックフィルム上にスクリーン印刷した分析要素が開示されている。

【0011】 印刷による分析要素の作製方法には、スクリーン印刷の他に、グラビア印刷、インクジェット印刷などが利用されている。しかし、これらの印刷方法においても、各々、以下のような欠点を有している。

【0012】 例えば、スクリーン印刷は、試薬液の液性が、一般に 1000 センチポイズ以上の高粘度のものであることが要求され、かつアミールアルコールのような高沸点の有機溶剤を含まなければならない。従って、変成しやすい酵素を含むものには不適當であり、また、一般に、印刷した膜の厚さの均一性、再現性を得るのは非常に困難を要する。

【0013】 グラビア印刷は、試薬液の粘性により、グラビアロールからフィルムへの転写効率が大きく変化し、転写効率の向上には、試薬液の粘性が低いものであることが要求される。一般的に試験紙の作製において、

酸化酵素及び過酸化酵素などを含む検出系をフィルムに固定化する必要性から、試薬液中へのポリマーの添加が不可欠であり、試薬液の粘性は高くなる。従って、印刷パターンの均一性、再現性を得るのは非常に困難を要する。

【0014】インクジェット印刷は、印刷インクを加熱、または帯電電極と電圧による印加することにより、液滴化し、吐出するため、かなりインクに付加が生じる。従って、分析要素の作製にインクジェット印刷を用いるには、インクである試薬液の液性において、酸化酵素及び過酸化酵素などを含む検出系試薬の耐熱性、例えば100～300℃の加熱により変性しないこと、もしくは帯電電極により簡単に帯電が可能である為の適度な帯電性をもつことなどが要求される。また、試薬液の液性の粘度、表面張力、濡れ性、比重などが、印刷の精度、均一性、再現性に関与するため、インクの液性仕様の決定は非常に困難を要する。

【0015】従って、上記のどの印刷方法についても、試薬液に要求される液性は、酸化酵素及び過酸化酵素などを含む検出系試薬にとってかなり過酷な条件である。

【0016】また、特開平2-150751号における試薬は、光を遮蔽する光反射性不溶性粒子を含有しているが、上記のどの印刷方法においても、赤血球除去あるいは反射性物質としての二酸化チタンや酸化マグネシウムなどの固形物を含ませることは難しい。なぜならば、これらの固形物は凝集しやすく、スクリーン印刷であれば刷版を、グラビア印刷であればグラビアロールを、インクジェット印刷であればインクジェットノズル及びプリントヘッドを目詰まりさせるため、印刷の精度、均一性、再現性を得ることが困難になるためである。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記のような欠点を解決し、小さい試薬面積を持ち、少量の試料で分析が可能な分析要素の作製方法であり、かつ試薬層の面積が小さくても迅速かつ簡易に、しかも精度よく多項目分析が可能な液体試料中の特定成分を分析するための分析要素を提供しようとするものである。

【0018】

【課題を解決するための手段】本発明は、体液試料中の特定成分を分析するための分析要素の作製方法において、分析するために必要な試薬を含む試薬液を、ディスペンサーにてフィルム上に滴下または点着し、作製することを特徴とする分析要素の作製方法である。さらにディスペンサーにて、フィルム上に滴下または点着した後、ただちに試薬表面を平滑な面を有する圧力棒の平滑な面で押し、加圧しながら平滑化し、乾燥させ、乾燥後、圧力棒を試薬面から離すことを特徴とする分析要素の作製方法である。また、本発明は、体液試料中の特定成分を分析するための分析要素であって、上記の作製方法によって作製され、平滑な試薬表面を有することを特

徴とする分析要素である。本発明を用いることで上記課題を解決できる。

【0019】本発明は、特開平2-150751号に適用できる方法であり、また、特公昭61-36181号にも適用できる方法である。従って、本発明に関わる用具の構成要素は、基本的に特開平2-150751号の記載に準ずる。また、特公昭61-36181号の記載にも準ずる。また、特開平2-150751号における試料保持層の固定などの応用も可能である。

【0020】

【発明の実施の形態】ディスペンサーは、比較的設備も小型で安価であり、試薬液の粘性についても低粘度から高粘度まで広い範囲で使用することができる。かつ、ディスペンサーは、試薬液を、小さな面積の範囲内に滴下又は点着することができるので、極めて少量の血液、例えば5～10μlの血液で、多項目分析することも可能である。

【0021】また、ディスペンサーで用いられる流路は、一般的にインクジェット印刷で用いられる流路よりも大きいので、上記に示した光を遮蔽するための光反射性不溶性粒子、例えば酸化チタンや酸化マグネシウムなどの凝集しやすいものを含有していても、目詰まりを起こしにくい。

【0022】試薬液をディスペンサーにてフィルム上に滴下または点着する際において、試薬液の粘性と支持体との関係は、

(1) 試薬液の粘性がほとんどなく、フィルムが吸水性の場合→吸水性フィルムに瞬時に吸収される。

(2) 試薬液の粘性がほとんどなく、フィルムが非吸水性の場合→非吸水性フィルム上にドーム状の液滴になる。

(3) 試薬液の粘性があり、フィルムが吸水性の場合→吸水性フィルムの上に固形物が残る。

(4) 試薬液の粘性があり、フィルムが非吸水性の場合→非吸水性フィルムの上にドーム状又は球状の液滴になり、試薬液が全て残る。

であり、(3)又は(4)が一般的である。

【0023】上記のような試薬液を、ディスペンサーを用いて、フィルム上に試薬液を滴下または点着することには問題は生じないが、そのまま乾燥すると、塗布厚の不均一、塗布表面の不均一、及び試薬濃度の不均衡が生じる。これによって、液体試料を分析するための試薬に発色剤を用いて発色させた場合に、ムラ発色の原因にもなる。

【0024】これを、先端部分が平滑な圧力棒の平滑部分で加圧し、試薬表面を平滑化することで解決した。つまり、本発明によって、塗布厚、塗布表面の均一な試薬面を作製することができた。

【0025】本発明における圧力棒とは、圧力を、滴下または点着した試薬液の表面に与える棒のことであり、

硬質なものであれば何でも良い。材質としては、例えば、ガラス、ゴム、プラスチック、ステンレスなどがあげられるが、寸法安定性及び熱安定性の面からステンレスが好適である。

【0026】また、圧力棒を試薬層表面から離す際に、乾燥した試薬が剥がれて圧力棒へ付着することを防ぐために、圧力棒の先端部分をテフロンで覆うことが、より好ましい。このことで、圧力棒への試薬の付着を防止することが可能となる。

【0027】圧力棒の先端部分は、試薬表面を覆う程度のものでよく、断面積の形状も、円であっても、四角であっても、六角形であっても何でもかまわない。例えば、試薬表面の面積が直径5mm程度であれば、圧力棒の先端部分の面積は、直径10mm程度でよい。

【0028】圧力棒が試薬表面に加える圧力は、好ましくは0.1~20kg/cm²、より好ましくは1~5kg/cm²がよい。

【0029】フィルムは、どのようなものでも可能であるが、望ましくは、寸法安定性がよく、試薬液をはじかないもので、乾燥後、試薬が剥離しないものがよい。例えば、反応に酸素が必要な場合、酸素供給層として、多孔性フィルムを用いることが有用であり、ニュークレポア（ニュークレポア製）、サイクロポア（ワットマン製）、セルガード（ヘキスト製）など多くのものが商品として販売されている。

【0030】乾燥方法は、圧力棒自身を熱することによる加熱であってよい。例えば、圧力棒の中に熱線を入れて圧力棒を加熱し、乾燥する方法などがある。温度は、一般的には、50℃~80℃に設定するが、試薬液に熱に弱い酵素などを含む場合は、比較的低い温度、例えば35℃~50℃に設定する。

【0031】また、乾燥方法が、圧力棒で加圧している際における、フィルムの下方からの加熱であってもよい。例えば、フィルムの下方に、熱線を内蔵したステンレス製のブロックを配置し、そのブロック上をフィルム

が通過することによって乾燥させる方法などがある。このブロック温度も、一般的には、50℃~80℃に設定するが、試薬液に熱に弱い酵素などを含む場合は、比較的低い温度、例えば35℃~50℃に設定する。加えて、ブロック温度は、フィルムが溶けない温度に設定する。

【0032】あるいは、乾燥方法が、圧力棒で加圧している際における、送風であってもよい。この送風温度も、一般的には、50℃~80℃に設定するが、試薬液に熱に弱い酵素などを含む場合は、比較的低い温度、例えば35℃~50℃に設定する。どの方法においても、乾燥後、圧力棒を試薬面から離せば分析要素が作製できる。

【0033】また、圧力棒を試薬面から離すタイミングは、十分乾燥後であれば、いつでも構わないが、出来る限り時間をかけて離すのがよい。

【0034】以下に実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0035】

【実施例】

血中グルコースの定量

厚さ10μmの多孔性フィルム（ニュークリポア（ニュークリポア製））を、7mm×7mmに裁断したものを、熱可逆性樹脂でコーティングされ、直径4mmの貫通穴を有するポリエチレンテレフタレート支持体の上に、貫通穴を覆うように重ね、熱圧着した。図1は、本発明を用いた分析要素の作製方法で、(a)から(f)は、その手順を示したものである。つまり、貫通穴上にある多孔性フィルム部分に、下記の試薬組成を混合した試薬溶液3をディスペンサー4にて3μl滴下し、直ちに先端が平滑で、かつ40℃に加温されたステンレス製圧力棒5で、1.5kg/cm²で加圧しながら、試薬表面を平滑化し、20分間乾燥させて、分析要素を作製した。

試薬組成：

グルコースオキシダーゼ（東洋紡製）	10ku
パーオキシダーゼ（東洋紡製）	20ku
4-アミノアンチピリン（キシダ化学製）	150mg
N-エチル-N-（2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル）-3, 5-ジメチルアニリン（同仁化学製）	200mg
0.15M リン酸緩衝液（pH7.0）	2ml
4%ヒドロキシプロピルセルロース水溶液（日本曹達製）	3ml
50% ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート水溶液（ナカライテスク製）	1.5ml
50%二酸化チタン水溶液（和光純薬製）	1.5g

【0036】

【比較例】図2は、比較例としてあげた分析要素の作製方法で、(a)から(d)は、その手順を示したものである。つまり、実施例に用いた試薬溶液3を、同様にデ

ィスペンサー4にて5μl滴下後、圧力棒で加圧せずに、40℃、20分間乾燥した分析要素を作製した。

【0037】実施例と比較例において作製した各分析要素に、種々のグルコース濃度の全血を20μl滴下し、

1分後に支持体の貫通穴を通して、下方より（多孔性フィルム側から）、色差計（（株）日本電色工業 Σ-90）で640nmでの反射率を測定した。

【0038】反射率から検量線を作成し、その検量線に

基づいて、測定値を濃度換算し、比較を行った。測定結果を、表1に示す。

【0039】

【表1】

グルコース 濃度 (mg/dl)	実施例		比較例	
	測定値 (mg/dl)	再現性 (%)	測定値 (mg/dl)	再現性 (%)
44	45.2	3.5	43.6	8.7
102	110.9	2.9	115.9	10.1
213	182.5	3.1	177.1	9.3
329	348.0	3.6	346.0	10.0
447	405.6	3.0	398.6	12.8
664	592.5	2.8	533.1	13.6

【0040】本発明による作製方法を用いた実施例の分析要素では、乾燥後の塗布厚、試薬表面は均一であるため、測定値の再現性もよく、良好な結果が得られた。しかし、比較例の分析要素では、再現性が悪かった。

【0041】

【発明の効果】以上、詳述したように、本発明の分析要素の作製方法を用いると、迅速かつ簡易に、精度良く、特定成分を分析するための分析要素を作製することができる。しかも、極めて少量の試料で、多項目分析することも可能になる。

【図面の簡単な説明】

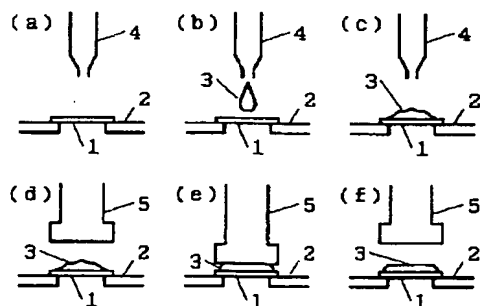
【図1】 実施例の一連の作製方法を示す図である。

【図2】 比較例の一連の作製方法を示す図である。

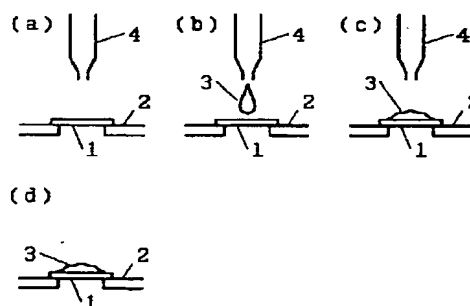
【符号の説明】

- 1 多孔性フィルム
- 2 支持体
- 3 試薬溶液
- 4 ディスペンサー
- 5 圧力棒

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 山口 武広

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

BEST AVAILABLE COPY